ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 45, 5, 2011

УДК 595.122

КЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В ПРОЯВЛЕНИИ ГЕО- И ФОТОРЕАКЦИЙ У ЦЕРКАРИЙ HIMASTHLA ELONGATA (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE)

© В. В. Прокофьев,[1] И. А. Левакин,[2, 3] Е. А. Лосев,[3] Я. В. Завирский,[1] К. В. Галактионов[2, 3]

[1] Псковский государственный педагогический ун-т им. С. М. Кирова,
естественно-географический ф-т, каф. зоологии и экологии животных
пл. Ленина, 2, Псков, 2180760
[2] Зоологический институт РАН
Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034
E-mail: kirill.galaktionov@gmail.com
[3] Санкт-Петербургский государственный университет, биолого-почвенный ф-т,
каф. зоологии беспозвоночных
Университетская наб., 7/9, С.-Петербург, 199034

Поступила 19.05.2011

Исследован характер проявления фото- и георeакций разновозрастными церкариями *Himasthla elongata*, принадлежащими разным клонам (клоном считались церкарии, выделенные одним зараженным моллюском *Littorina littorea*). Установлены значимые различия между клонами церкарий как по изначальному проявлению гео- и фотореакций, так и по их изменению с возрастом личинок. Предполагается наследственный характер выявленной межклональной изменчивости. Обосновывается представление о том, что поддержание высокого уровня генетического полиморфизма по признаку проявления ориентировочных реакций церкариями трематод может повышать их шансы на успешную трансмиссию.

Ключевые слова: трематоды, церкария, клон, фотореакция, георeакция, поведение, полиморфизм, изменчивость, адаптация, жизненный цикл.

В жизненном цикле трематод церкария играет роль расселительной личинки, которая обеспечивает передачу инвазионного начала от первого промежуточного хозяина (моллюска) ко второму промежуточному или к окончательному хозяевам. Для обеспечения этого процесса церкарии обладают системой поведенческих реакций, совокупное действие которых направлено на попадание личинки в «пространство хозяина» и во «время хозяина», следуя терминологии Комба и др. (Combes et al., 1994). Церкарии производятся группировками партенит (редиями или дочерними спороцистами), паразитирующими в моллюске-хозяине, которые, если исключить случаи множественной инвазии, происходят от единственного мирацидия, заразившего данную особь моллюска. Формирование группировки партенит в моллюске и продукция ими церкарий осуществляется путем апомиктического партеногенеза (см. обзоры: Гинецинская, 1968; Добровольский и др., 1983, 2000; Галактионов, Добровольский, 1998; Dobrovolskij, Ataev, 2003). Таким образом, все выделяемые моллюском, инвазированным одним мирацидием, личинки, согласно классическим воззрениям, оказываются генетически однородными, т. е. представляют собой клоны. Следовательно, и проявляемые ими поведенческие реакции также должны быть одинаковыми.

В ходе изучения особенностей поведения церкарий трематод, ассоциированных с литоральными экосистемами северных морей, было подмечено, что некоторое число выделяемых зараженными моллюсками личинок демонстрирует поведенческие реакции, отличные от характерных для большинства особей данного вида (Прокофьев, 1997, 2001, 2002, 2003; Галактионов, Добровольский, 1998). Доля таких церкарий, которые получили название «уклонистов», в общем пуле исследуемых личинок одного вида варьирует от 5 до 30 % (Прокофьев, 2006). Следует отметить, что в экспериментах, по результатам которых был установлен факт наличия «уклонистов», использовалась смесь церкарий, выделенных разными особями моллюсков. Поэтому они доказали только факт наличия достаточно существенной внутривидовой изменчивости по исследуемым признакам. В то же время оставалось неясным, как формируется подобная изменчивость — либо в каждом клоне церкарий присутствуют особи, различающиеся по своему поведению, либо же существуют клоны со «стандартным» и «нестандартным» («уклонисты») характером проявления поведенческих реакций. Выяснение этого вопроса и стало целью настоящего исследования. Уже в момент подготовки рукописи к печати вышла в свет работа Кохлера и др. (Koehler et al., 2011), в которой у вида *Maritrema novaezealandensis* Martorelli, Fredensborg, Mouritsen et Poulin, 2004 (Microphallidae) было продемонстрировано наличие внутри- и межклональной изменчивости церкарий по некоторым морфометрическим признакам, проявлению фотореакции и по продолжительности жизни.

Наше исследование выполнено на виде *Himasthla elongata* (Mehlis, 1831), принадлежащем сем. Echinostomatidae, которое на филогенетическом древе трематод далеко отстоит от микрофаллид (Cribb et al., 2003; Galaktionov, Dobrovolskij, 2003; Olson et al., 2003). Мы предприняли попытку выявить внутри- и межклональную изменчивость в проявлении гео- и фотореакций у церкарий этого широко распространенного в прибрежных экосистемах северных морей вида эхиностоматид. Мариты *H. elongata* паразитируют в чайках, роль второго промежуточного хозяина играют двустворчатые моллюски (на Белом море это преимущественно мидии *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758), а первого — литоральные моллюски *Littorina* spp. Выбор в качестве объекта исследования церкарий *H. elongata* определялся тем, что их поведенческие реакции исследовали ранее, причем было установлено наличие положительной гео- и отрицательной фотореакции (Прокофьев, 2006). В ходе экспериментов на пуле одновозрастных личинок *H. elongata*, выделенных разными особями зараженных литторин, было также выявлено наличие существенного процента «уклонистов» в проявлении этих реакций.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на базе Беломорской биологической станции (ББС) Зоологического института РАН. Зараженные редиями *H. elongata* моллюски *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758) (Prosobranchia: Littorinidae) были собраны на литорали губы Чупа Кандалакшского залива Белого моря в июле—августе 2010 г. Литторин поодиночке рассаживали в емкости объемом 100 мл с морской водой и оставляли на солнечном свету на 1 ч. После этого емкости с моллюсками просматривали под стереомикроскопом МБС-9 и отбирали особей, которые выделили за это время церкарий *H. elongata*. Таким способом было выявлено 18 зараженных *H. elongata* литторин, которых затем использовали как источник церкарий для последующих экспериментов. На раковины всех этих улиток были нанесены индивидуальные метки.

Церкарий *H. elongata*, полученных из одной инвазированной особи *L. littorea*, считали потомками одного мирацидия и рассматривали как принадлежащих одному клону (клон церкарий при дальнейшем изложении). Это допущение позволило сделать два факта. Во-первых, моллюсков собирали из поселения, где экстенсивность инвазии *H. elongata* (определенная по эмиссии церкарий из моллюсков старших размерно-возрастных групп) не превышала 1.4 % (наши данные). Во-вторых, его справедливость подтверждают результаты генетического исследования редий, выделенных из 200 экз. зараженных *L. littorea*, которых собирали в 2008—2010 гг. в том же поселении этих моллюсков, что и особей, участвовавших в наших экспериментах. Анализ геномной ДНК редий методом AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) показал, что уровень различий между редиями из одной особи моллюска всегда существенно ниже, чем между редиями, выделенными из разных особей литторин (Galaktionov et al., 2010; Галактионов Н. К., личное сообщение).

Перед получением церкарий для экспериментов зараженных *H. elongata* литорин содержали 12 ч без воды при температуре 15 °C в условиях 100%-ной влажности. Затем моллюсков помещали на 30 мин в отдельные емкости (100 мл), заполненные фильтрованной морской водой (ФМВ) естественной для Белого моря солености (24 ‰) с температурой 18—20 °C. Воду с выделенными церкариями сливали в конические пробирки (50 мл) и охлаждали до 2—4 °C, помещая пробирки в колотый лед. При охлаждении личинки *H. elongata* обратимо снижали подвижность и концентрировались на дне, что позволяло отобрать 100—300 церкарий в малом (10 мкл) объеме воды. Это позволяло избавиться от фекалий, слизи и растворимых продуктов жизнедеятельности *L. littorea*. Ранее нами было выяснено, что кондиционированная литоринами морская вода может вызывать спонтанное инцистирование церкарий *H. elongata*. Церкарий каждого клона переносили в несколько чистых емкостей (100 мл), заполненных свежей ФМВ с температурой 18 °C. Емкости с церкариями затем содержали в термостатированном (18 °C) помещении при освещенности 10—16 тыс. Лк. В каждую емкость помещали 70—200 церкарий. При изучении гео- и фотореакций церкарий *H. elongata* использовали 2 возрастные группы личинок: 1 и 6 ч, отсчитывая с момента помещения личинок в емкость с ФМВ. Выбор личинок именно этих возрастов связан с тем, что наиболее активный период их жизнедеятельности церкарий *H. elongata* приходится на первые 10—12 ч их жизни, вслед за чем следует ослабление активности и гибель через 26—30 ч после выхода из моллюска-хозяина (Прокофьев, 2006).

Геореакцию церкарий *H. elongata* определяли по вертикальному распределению личинок в столбе воды по методике, описанной Прокофьевым (2002). ФМВ с церкариями аккуратно заливали в вертикально расположенную бюретку длиной 50 см и диаметром 1 см, равномерно освещенную (10 000 Лк) параллельно закрепленной люминесцентной лампой дневного света. Через 15 мин воду с церкариями сливали в 3 отдельные емкости таким образом, что в первую емкость попадало 20 % объема из нижней части бюретки («нижняя зона»), во вторую 60 % объема из средней части бюретки («средняя зона»), а в третью — 20 % объема бюретки из ее верхней части («верхняя зона»). Церкарий обездвиживали и подкрашивали, добавляя водный раствор йода, а затем подсчитывали их число в каждой емкости, используя стереомикроскоп МБС-9.

Фотореакцию церкарий *H. elongata* оценивали по распределению личинок в градиенте освещенности по методике, описанной Прокофьевым (2001). ФМВ с церкариями помещали в горизонтально расположенную прямоугольную плоскодонную камеру (135 × 30 × 30 мм), изолированную от внешних источников света. Одностороннее освещение создавало вдоль длинной оси камеры градиент от 15 000 Лк до 3000 Лк. Источником света служила лампа накаливания. Для подведения света к камере использовали световод, поглощавший инфракрасное излучение. Это сводило к минимуму влияние на распределение церкарий градиента температуры. После 10 мин содержания церкарий в градиенте освещенности камеру разделяли перегородками на 3 равные части, препятствуя перемещению личинок вдоль светового градиента. Количество церкарий затем регистрировали для каждого отдела камеры.

При изучении гео- и фотореакций использовали по 4 пробы церкарий одного возраста каждого клона. Однако из-за недостаточного числа выделенных моллюсками личинок при изучении фотореакции нескольких клонов *H. elongata* (1, 2, 13, 16 и 17) пришлось ограничиться тремя повторами для церкарий каждого возраста. Геореакцию исследовали у первых 12 клонов церкарий *H. elongata*. Проявление фотореакции удалось проанализировать только у 8 из них, поскольку личинки клонов 3, 6, 8 и 11 выделились из моллюсков в количестве, недостаточном для их вовлечения в эксперимент. Фотореакции также были изучены у представителей 6 клонов, для которых анализ геореакции не проводился.

Статистическую обработку данных выполняли в соответствии со стандартными рекомендациями (Лакин, 1990). Гипотезу о равномерности распределения церкарий в экспериментальных установках тестировали при помощи критерия χ^2. Теоретическое количество церкарий при равномерном распределении в любой области полагали пропорциональным объему этой области. Все доверительные интервалы вычисляли для 95%-ного уровня значимости. Границы асимметричных доверительных интервалов приведены в круглых скобках после среднего значения. Доверительные интервалы долей вычисляли по точной формуле Фишера (Животовский, 1991). Влияние межклональной изменчивости и возраста церкарий на их распределение по выделенным зонам экспериментальных установок оценивали при помощи двухфакторного дисперсионного анализа с факторами «Клон» и «Возраст» церкарий. Для каждой зоны формировали отдельный дисперсионный комплекс. Силу влияния фактора оценивали по Плохинскому. Достоверность межгрупповых различий средних (Post-hoc) оценивали по Шиффе (Scheffe), а в случае равновеликих групп (геореакция) — также по Тюки (Tukey). Перед проведением дисперсионного анализа доли подвергали нормализирующему arcsin-преобразованию. Средние и границы их доверительных интервалов подвергали обратному преобразованию. Все расчеты выполнены в программе Statistica 7.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Геореакция. Вертикальное распределение церкарий *Himasthla elongata* каждого из изученных клонов было крайне неравномерным (ФОРМУА). В целом личинки демонстрировали положительную геореакцию, концентрируясь в нижней зоне (рис. 1). При объединении данных по разновозрастным личинкам (1 и 6 ч) здесь находилось в среднем 55.4 % (49.1—61.7 %) от общего числа церкарий. В то же время значение этого показателя испытывало сильную межклональную изменчивость и варьировало от 13.8 % (8.6—20 %) у клона 1 до 85.2 % (71.7—94.9 %) у клона 12. Зарегистрированные в нижней зоне доли церкарий значимо не различались у клонов со смежными номерами (1 и 2, 2 и 3 и т. д.), а также у клонов 1—3 (3 наименьших значения долей) и клонов (7—12) (3 наибольших значений долей) (рис. 1).

В верхней зоне сосредоточивалось в среднем 28.2 % (23.3—33.4 %) личинок. При этом доля церкарий у клонов 1—3 превышала здесь долю церкарий, зарегистрированную для клонов 8—12 ($P < 0.05$), у клона 4 была

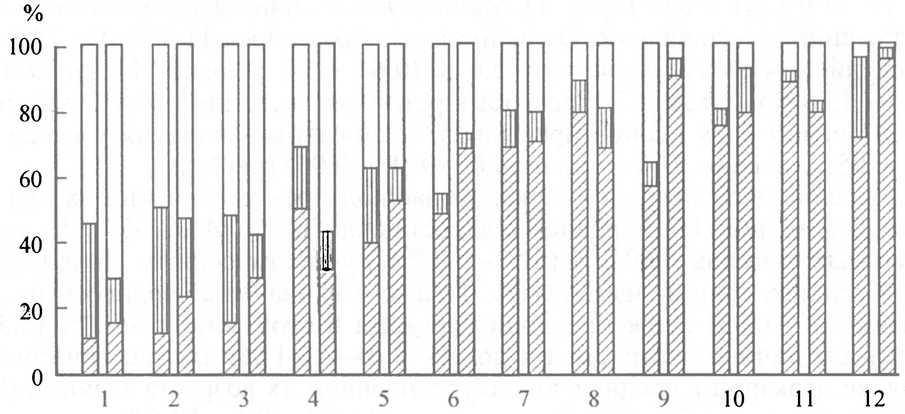

Рис. 1. Вертикальное распределение церкарий *Himasthla elongata* разных клонов (1—12 по оси абсцисс) в столбе воды в бюретке.

Доли церкарий (%) отложены по оси ординат. В каждом столбце гистограммы белый участок — верхняя зона (верхние 20 %) столба воды в бюретке; точечный участок — средняя зона (средние 60 %) и заштрихованный участок — нижняя зона (20 %). Первый столбец каждой пары отражает распределение церкарий возраста 1 ч, а второй — возраста 6 ч.

Fig. 1. Vertical distribution of cercariae *Himasthla elongata* belong to different clones (1—12, X-axis) in water column in experimental burette.

Таблица 1

Влияние межклональной изменчивости и возраста церкарий на их долю в каждой из трех вертикальных зон бюретки (три дисперсионных комплекса)

Table 1. Influence of cercarial interclonal variability and age on their distribution in three vertical zones of experimental burette (two-way ANOVA, three-variance complex)

Зона (% от общего объема бюретки)	Фактор	Уровень значимости влияния фактора (P)	Сила влияния фактора (η^2)*	Уровень значимости силы влияния фактора P(η^2)	Post-hoc**
Верхняя (20%)	«Клон»	<<0.01	62.3 % (!)	<<0.01	T = 29, S = 19
	«Возраст»	>0.05	0.1 %	>0.05	—
	Взаимодействие	<0.01	12.3 %	>0.05	T = 63, S = 6
	Внутригрупповая		25.4 %		
Средняя (60%)	«Клон»	<0.01	30.9 % (!)	<0.01	T = 5, S = 1
	«Возраст»	<0.05	4.5 %	>0.05	T = 1, S = 1
	Взаимодействие	>0.05	9.8 %	>0.05	—
	Внутригрупповая		54.7 %		
Нижняя (20%)	«Клон»	<<0.01	78 % (!)	<<0.01	T = 41, S = 35
	«Возраст»	<0.01	2.4 %	>0.05	T = 1, S = 1
	Взаимодействие	<0.01	7.1 %	>0.05	T = 124, S = 60
	Внутригрупповая		12.5 %		

Примечание. * — по Плохинскому; ** — число достоверных ($P < 0.05$, T — по: Tukey, S — по: Scheffe) парных различий; (!) — значимые значения силы влияния фактора.

выше, чем у клонов 8, 11 и 12 ($P < 0.05$), а у клонов 5 и 6 выше, чем у клонов 10, 11 и 12 ($P < 0.05$) (рис. 1). Меньше всего личинок оказалось в самой протяженной средней зоне. В среднем там находилось 11.4 % (9—14.1 %) церкарий при варьировании от 2.6 % (0.6—6 %) у клона 11 до 28.1 % (13.5—45.6 %) у клона 2. Зарегистрированная в средней зоне доля церкарий первых трех клонов превышала аналогичные значения у клона 11 ($P < 0.05$), а у клона 2 — у клонов 6 и 9 ($P < 0.05$) (рис. 1).

С увеличением возраста церкарий наблюдалось увеличение их доли в нижней зоне (рис. 1). В среднем она составила 50.7 % (41.6—59.7 %) у одночасовых личинок и 60.2 % (51.3—68.7 %) у шестичасовых. Доля церкарий в верхней зоне не изменялась. Только у клона 9 наблюдалось значительное ($P < 0.05$) снижение доли церкарий в этой зоне с 36.7 % (8.5—1.4 %) для личинок возраста 1 ч до 2.6 % (0—20.1 %) для шестичасовых. Доля же церкарий в средней зоне с увеличением их возраста значимо ($P < 0.05$) сокращалась. Ее значение составило 14.2 % (9.6—19.5 %) для одночасовых личинок и 8.9 % (6.9—11 %) для шестичасовых.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния межклональной изменчивости (фактор «Клон») и возраста церкарий *H. elongata* (фактор «Возраст») на их вертикальное распределение в экспериментальных условиях показали, что первый фактор оказывается наиболее значимым (табл. 1). Все различия, связанные с фактором «Возраст» церкарий и взаимодействием факторов («Клон»—«Возраст»), объясняли не более

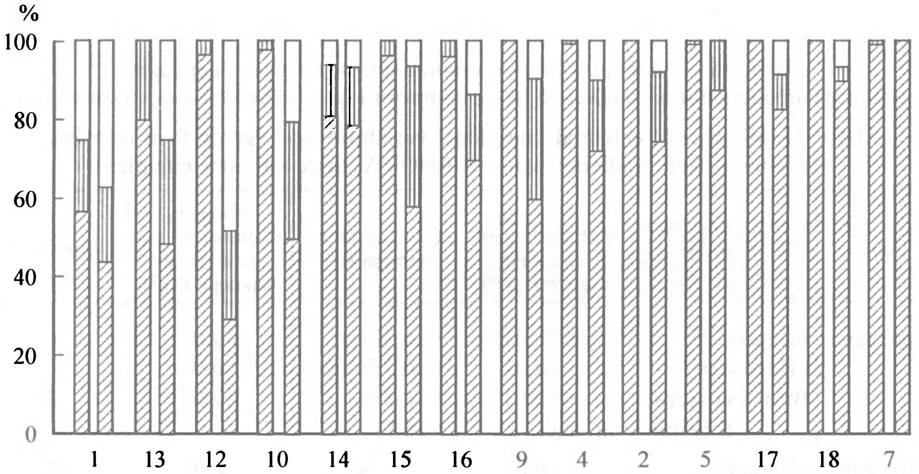

Рис. 2. Распределение церкарий *Himasthla elongata* различных клонов в экспериментальной камере в градиенте освещенности.

Номера клонов приведены на оси абсцисс. Доли церкарий (%) отложены по оси ординат. В каждом столбце гистограммы белый участок — наиболее освещенная зона, заштрихованный участок — наиболее темная зона, точечный участок — промежуточная зона. Первый столбец каждой пары отражает распределение церкарий возраста 1 ч, а второй — возраста 6 ч.

Fig. 2. Distribution of cercariae *Himasthla elongata* belong to different clones in experimental chamber with illumination gradient.

14.3 % наблюдаемой дисперсии. При этом доля церкарий в средней зоне в наименьшей степени зависела от межклональной изменчивости и возраста церкарий — более половины наблюдаемой дисперсии приходится на внутригрупповую (табл. 1).

Фотореакция. Так же как и в случае геореакции, распределение церкарий *H. elongata*, принадлежащих различным клонам, по трем зонам экспериментальной установки с различной освещенностью оказалось неравномерным ($P_{\chi^2} < 0.01$) (рис. 2). Большинство личинок концентрировалось в наименее освещенной («темной») зоне (рис. 2). При объединении выборок по разновозрастным церкариям здесь оказалось в среднем 86.7 % (82—90.8 %) церкарий, при варьировании от 53.2 % (41—65.3 %) у клона 1 до 99.8 % (98.5—100 %) у клона 7. Доля личинок последнего клона в «темной» зоне значимо превышала долю церкарий клонов 1, 10 и всех клонов с 12 по 15 ($P < 0.05$). Аналогичные соотношения выявлены для церкарий клонов 5, 17 и 18 по отношению к клонам 1, 12, 13, 15 ($P < 0.05$), клонов 4 и 9 к клонам 1 и 13 ($P < 0.05$) и клона 2 к клону 1 ($P < 0.05$) (рис. 2).

Меньше всего церкарий было в наиболее освещенной («светлой») зоне, где их доля в среднем составляла 3.5 % (1.9—5.4 %), варьируя от 0 % у клонов 5 и 8 до 28.4 % (17.9—40.3 %) у клона 1. Доля церкарий клона 1 в «светлой» зоне была выше, чем у всех остальных клонов ($P < 0.01$), за исключением 12, 13 и 14. Значение этого показателя у клона 12 превышало зарегистрированное для клонов 5 и 7 ($P < 0.01$), а клона 13 — клона 5 ($P < 0.05$). Относительно небольшое число церкарий обнаруживалось в средней зоне с промежуточной освещенностью, где доля личинок составляла в среднем 7.8 % (5.5—10.4 %) и варьировала от 0.2 % (0—1.5 %) у клона 7 до 24.5 % (14—36.9 %) у клона 13. В этой зоне значимые превыше-

Таблица 2

Влияние межклональной изменчивости и возраста церкарий
на их распределение в градиенте освещенности (три дисперсионных комплекса)

Table 2. Influence of cercarial interclonal variability and age on their distribution
in illumination gradient (two-way ANOVA, three-variance complex)

Зона	Фактор	Уровень значимости влияния фактора (P)	Сила влияния фактора (η^2)*	Уровень значимости силы влияния фактора $P(\eta^2)$	Post-hoc**
«Светлая»	«Клон»	<<0.01	36 % (!)	<0.01	13
	«Возраст»	<<0.01	30.7 % (!)	<<0.01	1
	Взаимодействие	<<0.01	18.3 %	>0.05	27
	Внутригрупповая		15 %		
«Средняя»	«Клон»	<<0.01	32.6 % (!)	<0.01	12
	«Возраст»	<<0.01	32.2 % (!)	<<0.01	1
	Взаимодействие	<<0.01	17.1 %	>0.05	10
	Внутригрупповая		18.1 %		
«Темная»	«Клон»	<<0.01	36.4 % (!)	<0.01	23
	«Возраст»	<<0.01	36.6 % (!)	<<0.01	1
	Взаимодействие	<<0.01	14.9 %	>0.05	43
	Внутригрупповая		12.1 %		

Примечание. * — по Плохинскому; ** — число достоверных ($P < 0.05$, по: Scheffe) парных различий; (!) — значимые значения силы влияния фактора.

ния доли церкарий выявлены у клонов 13 и 15 по отношению к клонам 5, 7, 17 и 18 ($P < 0.05$), клона 15 — к клону 4 ($P < 0.05$), клона 1 — к клонам 7 и 18 ($P < 0.05$) и клона 14 — к клону 7 ($P < 0.05$).

Доля церкарий в «темной» зоне существенно снижалась ($P < 0.01$) с увеличением их возраста, составляя 96.8 % (93.8—98.9 %) для одночасовых особей и только 72.9 % (65.7—79.5 %) для шестичасовых. В остальных зонах наблюдался рост числа церкарий, несколько более выраженный в промежуточной зоне. Средняя доля церкарий увеличивалась здесь с 2.2 % (0.9—4 %) для одночасовых личинок до 15.4 % (11.7—9.4 %) для шестичасовых ($P < 0.01$), тогда как соответствующие значения в «светлой» зоне составили 0.4 % (0—1.3 %) и 8.6 % (5.2—12.7 %) ($P < 0.05$).

Различия в распределении церкарий *H. elongata* в градиенте освещенности примерно в равной степени зависели как от межклональной изменчивости (фактор «Клон»), так и от возраста (фактор «Возраст») церкарий (табл. 2). Всего на долю факторной дисперсии приходилось более 81.9 % (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные материалы однозначно свидетельствуют о наличии как внутриклональной, так и межклональной изменчивости в проявлении гео- и фотореакций церкариями *H. elongata*. Большинство личинок следует схеме поведения (положительная геореакция и отрицательная фотореакция), характерной для вида. Однако степень проявления этого типичного поведения оказывается различной у каждого клона. Эти различия выявляются у церкарий обеих тестированных нами возрастных групп.

Особенно сильная вариабельность наблюдалась в проявлении геореакции. В проведенных экспериментах личинки первых трех из тестированных нами клонов демонстрировали вертикальное распределение в столбе воды, противоположное тому, которое характерно для большинства других клонов и считается стандартным для церкарий *H. elongata* (Прокофьев, 2006) (рис. 1). Обращает на себя внимание и тот факт, что межклональная изменчивость в проявлении геореакции значительно менее выражена в средней зоне бюретки по сравнению с нижней и верхней (табл. 1). Возможно, это объясняется тем, что группу церкарий в средней зоне составляют личинки с неустоявшимся еще поведением. В пользу этого предположения свидетельствует сокращение доли церкарий *H. elongata* в промежуточной зоне с увеличением возраста личинок (рис. 1). Из литературы известно, что окончательная «настройка» поведения церкарий эхиностоматид происходит в течение 1—2 ч после эмиссии (Evans, Gordon, 1983; Evans, 1985; Haas et al., 1995; Loy et al., 2001). По-видимому, это справедливо и по отношению к церкариям *H. elongata*. С увеличением возраста личинок их доля в средней зоне сокращалась, тогда как в нижней, где сосредоточивались церкарии с типичным поведением, увеличивалась. Это увеличение вряд ли можно объяснить чисто физиологическими особенностями, т. е. расходованием гликогена по мере старения личинок и как следствие невозможностью для них удерживаться в верхних слоях воды. Против подобного предположения свидетельствует отсутствие достоверных изменений в доле разновозрастных церкарий одного клона, обнаруженных в верхней зоне. Более того в некоторых случаях в этой зоне выявлялась тенденция к росту доли личинок по мере увеличения их возраста (клоны 1—4, 8 и 11; рис. 1).

Различия в распределении церкарий *Himasthla elongata* в градиенте освещенности примерно в равной степени зависели как от межклональной изменчивости, так и от возраста церкарий (табл. 2). С увеличением возраста церкарий с 1 до 6 ч существенно снижалась доля церкарий с типичной (отрицательной) фотореакцией (рис. 2). Это сопровождалось увеличением доли церкарий в наиболее освещенной и промежуточной зонах. Создается впечатление, что в отличие от геореакции, фотореакции шестичасовых церкарий «размываются» по сравнению с реакциями личинок часового возраста. Такое «размывание» может быть адаптивным. Церкарии, которые не смогли в течение первых часов своей жизни найти потенциального хозяина в том «пространстве» и «времени», где его появление наиболее вероятно, получают таким образом шанс продолжить поиск в менее типичных местах, где могут иметь успех. Подобное изменение со временем знака поведенческих реакций отмечалось ранее для мирацидиев и церкарий ряда видов трематод (см. обзоры: Семенов, 1991; Галактионов, Добровольский, 1998; Прокофьев, 2006).

Межклональные различия церкарий по проявлению гео- и фотореакций сводились не только к различному распределению личинок (вертикальному либо в градиенте освещенности), но и к различному (иногда разнонаправленному) изменению этого распределения с течением времени (рис. 1, 2). На неслучайный характер этого явления указывает полученное при дисперсионном анализе достоверное взаимодействие факторов «Клон»—«Возраст» (табл. 1, 2). Таким образом, оказывается, что между клонами существуют не только значимые различия по изначальному проявлению фото- и геореакций, но и по характеру изменений этих признаков с возрастом. Учитывая, что генотипы церкарий *H. elongata* каждого клона должны соответствовать генотипу мирацидия, заразившего данного моллюска, можно с высокой вероятностью предположить, что отмеченные межклональные различия в поведении личинок имеют наследственную природу.

Проведенное исследование позволяет сделать вывод, что в популяции *H. elongata* поддерживается определенный уровень генетического полиморфизма по признаку проявления гео- и фотореакций. Поддержание этого полиморфизма может повышать шансы на успех трансмиссии личинок. Большинство клонов церкарий в целом ориентированы на попадание в «пространство» и «время» основного второго промежуточного хозяина — мидии. Именно сочетание положительной геореакции и отрицательной фотореакции приводит церкарий *H. elongata* в придонные слои воды, где возможен их контакт с мидиями. В то же время противоположные знаки в проявлении одной или обоих из рассматриваемых поведенческих реакций могут обеспечить всплытие личинок в верхние слои воды, что будет способствовать их более широкой дисперсии приливными течениями и волновой гидродинамикой. Это может повысить шансы на встречу церкарий *H. elongata* со своими вторыми промежуточными хозяевами в разреженных поселениях мидий и препятствовать чрезмерно интенсивному заражению мидий вблизи места выхода церкарий из моллюска-хозяина. Кроме того, церкарии с отличным от базового для вида поведением имеют шансы заразить тех хозяев, которые распределяются за пределами зоны концентрации основной массы особей своего вида. Для рассматриваемых личинок *H. elongata* это могут быть, например, мидии, которые локализуются не на поверхности грунта, а на всплывающих во время прилива талломах макрофитов.

Возможность более широкой дисперсии и заражения разных видов животных-хозяев или особей одного вида, но с различным характером поведения или распределения в пространстве и времени, по-видимому, способствует поддержанию межклональной изменчивости в поведении церкарий. Следует отметить, что высокий уровень такого полиморфизма отмечен у личинок, далеко отстоящих друг от друга в филогенетическом отношении таксонов — представителей эхиностоматид (*H. elongata*) (настоящее исследование) и микрофаллид (*Maritrema novaezealandensis*) (Koehler et al., 2011). Существенно различаются не только морфофункциональные и поведенческие характеристики церкарий этих двух видов, но и особенности биологии их вторых промежуточных хозяев. Для *H. elongata* эту роль играют крайне малоподвижные мидии, в которых церкарии попадают с токами воды через вводной сифон. Церкарии же *M. novaezealandensis* активно внедряются в разные виды морских ракообразных, которые служат их вторыми промежуточными хозяевами (Koehler, Poulin, 2010). По-видимому, феномен межклональной изменчивости у церкарий трематод распространен весьма широко, если не повсеместно. Следует подчеркнуть, что помимо вышесказанного «церкарии-уклонисты» могут представлять собой популяционный потенциал для колонизации новых видов животных-хозяев.

В заключение следует отметить, что в формировании внутривидовой изменчивости у трематод основная роль, несомненно, принадлежит генетическим рекомбинациям, которые имеют место при созревании и слиянии гамет на стадии мариты. Именно этот процесс обеспечивает появление мирацидиев, обладающих разными генотипами. Однако в последнее время появились сведения о наличии внутриклональной генетической изменчивости как у партенит, так и у церкарий трематод (Grevelding 1999; Халтурин и др., 2000; Bayne, Grevelding, 2003; Семенова и др., 2005, 2007), в том числе и у *Himasthla elongata* (Galaktionov et al., 2011). Речь идет о выявлении определенного уровня генетической изменчивости у особей, произведенных либо одной партеногенетической особью (материнской спороцистой), либо размножающимися путем партеногенеза потомками этой особи (редиями или дочерними спороцистами). Формирование подобной изменчивости может быть связано с митотическими рекомбинациями при партеногенетическом размножении (Bayne, Grevelding, 2003; Galaktionov et al., 2011). Таким образом, повышается уровень внутриклональной изменчивости, что фенотипически может проявляться и в повышении изменчивости по характеру поведенческих реакций.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 10-04-00430) и СПбГУ (№ 1.37.80.2011).

Список литературы

Галактионов К. В., Добровольский А. А. 1998. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод. СПб.: Наука. 404 с.

Гинецинская Т. А. 1968. Трематоды — их жизненные циклы, биология и эволюция. Л.: Наука. 411 с.

Добровольский А. А., Галактионов К. В., Атаев Г. В. 2000. Особенности организации генеративного материала и динамика размножения материнских спороцист трематод. Паразитология. 34 (1): 14—24.

Добровольский А. А., Галактионов К. В., Мухамедов Г. К., Синха Б. К., Тихомиров И. А. 1983. Партеногенетические поколения трематод. Тр. Ленингр. общ-ва естествоисп. 82 (4): 1—108.

Животовский Л. А. 1991. Популяционная биометрия. М.: Наука. 269 с.

Лакин Г. Ф. 1990. Биометрия. М.: Высшая школа. 352 с.

Прокофьев В. В. 1997. Реакции на свет церкарий морских литоральных трематод Cryptocotyle sp. (Heterophyidae) и Maritrema subdolum (Microphallidae). Зоол. журн. 76 (3): 275—280.

Прокофьев В. В. 2001. Реакции на свет церкарий морской литоральной трематоды Renicola thaidus (Trematoda; Renicolidae). Паразитология. 35 (3): 429—435.

Прокофьев В. В. 2002. Особенности вертикальной дисперсии в толще воды церкарий морской литоральной трематоды Renicola thaidus (Trematoda: Renicolidae). Паразитология. 36 (4): 316—323.

Прокофьев В. В. 2003. Характер вертикального распределения в толще воды церкарий трематод Cryptocotyle concavum (Heterophyidae) и Maritrema subdolum (Microphallidae). Паразитология. 37 (3): 207—215.

Прокофьев В. В. 2006. Стратегии заражения животных-хозяев церкариями трематод: опыт анализа в экосистемах прибрежья морей и озер северо-запада России: Дис. ... д-ра биол. наук. Зоол. ин-т РАН. СПб. 545 с.

Семенов О. Ю. 1991. Мирацидий. Тр. Ленингр. общ-ва естествоисп. 83 (4): 1—204.

Семенова С. К., Хрисанфова Г. Г., Филиппова Е. К., Беэр С. А., Воронин М. В., Рысков А. П. 2005. Индивидуальная и популяционная изменчивость церкарий шистосоматид группы Trichobilharzia ocellata (Trematoda, Schistosomatidae), выявляемая с помощью полимеразной цепной реакции. Генетика. 41 (1): 17—22.

Семенова С. К., Хрисанфова Г. Г., Корсуненко А. В., Воронин М. В., Беэр С. А., Водяницкая С. В., Сербина Е. А., Юрлова Н. И., Рысков А. П. 2007. Мультилокусная изменчивость партеногенетического потомства — церкарий трематод разных видов (класс Trematoda). Докл. РАН. 414 (4): 570—573.

Халтурин К. В., Михайлова Н. А., Гранович А. И. 2000. Генетическая неоднородность природных популяций партенит Microphallus piriformes и M. pygmaeus (Trematoda: Microphallidae). Паразитология. 34 (6): 486—500.

Bayne C. J., Grevelding C. G. 2003. Cloning of Schistosoma mansoni sporocysts in vitro and detection of genetic heterogeneity among individuals within clones. Journ. Parasitol. 89 (5): 1056—1060.

Cribb T. H., Bray R. A., Olson P. D., Littlewood D .T. J. 2003. Life cycle evolution in the Digenea: a new perspective from phylogeny. Advances in Parasitology. 54: 197—254.

Combes C., Fournier A., Moné H., Théron A. 1994. Behaviours in trematode cercariae that enhance parasite transmission: patterns and processes. Parasitology. 109S: S3—S13.

Dobrovolskij A. A., Ataev G. L. 2003. The nature of reproduction of trematodes rediae and sporocysts. In: Hommage à Louis Euzet — Taxonomy, Ecology, and Evolution of Metazoan Parasites. Perpignan, France: Presses Universitaires de Perpignan. 1: 273—290.

Evans N. A. 1985. The influence of environmental temperature upon transmkission of the cercariae of Echinostoma liei (Digenea: Echinostomatidae). Parasitology. 90: 269—275.

Evans N. A., Gordon D. M. 1983. Experimental studies on the transmission dynamics of the cercariae of Echinoparyphium recurvatum (Digenea: Echinostomatidae). Parasitology. 87: 167—174.

Galaktionov K. V., Dobrovolskij A. A. 2003. The biology and evolution of trematodes: an essay on the biology, morphology, life cycles, transmission, and evolution of digenetic trematodes. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publ. 592 p.

Galaktionov N. K., Fedorov A. V., Solovieva A. I., Podgornaya O. I. 2011. Detection of variable genomic sites in the genome of Himasthla elongata (Trematoda: Echinostomatidae) larvae. Mol. Biol. Evol. 31 (3): 2431—2440.

Galaktionov N. K., Solovieva A. I., Fedorov A. V., Podgornaya O. I. 2010. DNA transposon mariner evolvement in Himasthla elongata clonal variation. In: 14th Evolutionary Biology Meeting in Marseille. September 21—24. Conference Abstract Book. 24—25.

Grevelding C. G. 1999. Genomic instability in Schistosoma mansoni. Mol. Biochem. Parasitol. 101: 207—216

Haas W., Körner M., Hutterer E., Wegner M., Haberl B. 1995. Finding and recognition of the snail intermediate hosts by 3 species of echinostome cercariae. Parasitology. 110: 133—142.

Koehler A. V., Poulin R. 2010. Host partitioning by parasites in an intertidal crustacean community. Journ. Parasitol. 96: 862—868.

Koehler A. V., Springer Y. P., Keeney D. B., Poulin R. 2011. Intra- and interclonal phenotypic and genetic variability of the trematode Maritrema novaezealandensis. Biol. Journ. Linn. Soc. 103: 106—116.

Loy Ch., Motzel W., Haas W. 2001. Photo- and geo-orientation by echinostome cercariae results in habitat selection. Journ. Parasitol. 87 (3): 505—509.

Olson P. D., Cribb T. H., Tkach V. V., Bray R. A., Littlewood D. T. J. 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). Int. Journ. Parasitol. 33: 733—755.

CLONAL VARIABILITY IN EXPRESSION OF GEO- AND PHOTOORIENTATION IN CERCARIAE OF HIMASTHLA ELONGATA (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE)

V. V. Prokofiev, I. A. Levakin, E. A. Losev, Ya. V. Zavirsky, K. V. Galaktionov

Key words: trematode, cercaria, clone, photoorientation, geoorientation, behaviour, polymorphism, variability, adaptation, life cycle.

SUMMARY

The study was carried out on *Himasthla elongata*, a digenean common in the coastal ecosystems of the northern European seas. This species utilises intertidal prosobranchs Littorina spp. as the first intermediate host, bivalves (in the White Sea, Mytilus edulis) as the second intermediate host and gulls as the final host. The periwinkles *Littorina littorea* infected with *H. elongata* rediae (parthenogenetic generations) were sampled in the intertidal of the White Sea (66°20′ N, 33°38′ E) and used as the source of cercariae. Periwinkles were collected from the settlement with the low prevalence of *H. elongata*. As shown earlier with the use of AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) method, rediae groups in all the infected periwinkles of this settlement arise from the infection of a mollusc with a single miracidium. Therefore, the cercariae shed by an infected mollusc have the same genotype or, in other words, represent a clone.

Photo- and geoorientation of cercariae originating from different clones and aged 1 h and 6 h were analysed separately. It was shown that in general the larvae of each clone followed the behavioural pattern characteristics of the species (positive geoorientation and negative photoorientation). However, the degree of expression of this typical behaviour was different in different clones. An especially high variability was observed in the manifestation of geoorientation (in several clones, most larvae demonstrated negative geoorientation). Differences in the distribution of cercariae in the illumination gradient were almost equally associated with the interclonal variability and the age of the larvae. On the whole, as the age of cercariae increased, the positive geoorientation became more prominent, whereas the ratio of cercariae with the typical (negative) photoorientation decreased. Statistical analysis revealed significant differences between the cercarial clones both in the initial manifestation of geo- and photoorientation and in the changes in the character of these reactions with the larval age. Taking into account that each cercarial clone investigated had the same genotype, it seems very likely that the interclonal differences noted in this study are hereditary. Maintenance of a rather high level of genetic polymorphism by the character «expression of orientation reaction» in trematode cercariae may enhance the chances for successful transmission of these larvae. Such variability increases the scale of cercarial dispersion in space and promotes the successful infection of the hosts, whose behaviour is also subject to intra- and inter-population variability. Besides, cercariae whose behaviour deviates from the basic behaviour of the species may play the role of the population's potential for colonisation of new species of animal hosts.